

つ SNP 部位も除き解析を行った。

Index case の分析結果を含めて解析することで Index case と家族内感染 (M-1 及び S-1) 間で 5 箇所共通する SNP を見出した。また、M-1 だけが持ち Index case と S-1 には存在しない SNP (4211195) が 1 箇所あった。出張先の同僚 (T-1) に関してこれら家族内で共通の 5 箇所及び M-1 にだけ存在する 4211195 位の SNP は存在せず、H37Rv の塩基配列と同じだった。検出された 5 箇所の SNP 部位 (① Rv1184c, 217: V => A, ② Rv1291c, 18: A => S, ③ *trpE*, 259: Q => E, ④ *coaE*, 312: D => G, ⑤ Rv3015c, 283: V => A) は、非同義置換 (アミノ酸変異が伴う) 変異なので、発現される酵素の代謝活性に影響を与えている可能性が高いと考えられる。特に *trpE* (アントラニル酸シンターゼ) はグルタミンがグルタミン酸へ、*coaE* (デホスホ-CoA キナーゼ) はアスパルギン酸がグリシンへと電荷変化を伴うアミノ酸変異なので、酵素の二次構造が変化する可能性が高い。

4. M 株の遺伝子型

M 株は、共通の IS6110 RFLP、反復配列多型パターンを持つ北京型株で、世界的に広まっている新興タイプの結核菌だった。また、共通の性質としてストレプトマイシン耐性を持っていることが確認できた。

5. 次世代シーケンサーを用いた SNP 解析

M 株が独自に持つ SNP が 100 箇所存在することが判明した。これら SNP の内、59 箇所がサイレントで、残り 41 箇所がアミノ酸変異を伴う非同義置換 SNP だった。

6. 非同義置換 SNP を持つ蛋白質 (酵素) の抗酸菌での過剰発現

41 種類の非同義置換 SNP を持つ蛋白質の内、16 種類についてはデータベースを用いた相同性解析から機能を推定できた。今年度はこれらのうち、6 種類の遺伝子に絞り抗酸菌で過剰発現実験を行った。候補遺伝子は、*fadD25* (1752-bp)、*fadB3* (915-bp)、*fadE17* (1230-bp)、*ftsQ* (945-bp)、*kdtB* (486-bp)、*hsaD* (876-bp) とし、pVV16 ベクター (5.8k-bp) の *NdeI/HindIII* サイトに各遺伝子を導入した。野生型 (BCG 株由来の遺伝子) と変異型 (M 株の SNP を持つ遺伝子) を *M. smegmatis* 及び *M. bovis* BCG に導入して表現型の変化を調べた (図 2)。

M. smegmatis をホストにした場合はエレクトロポレーションの 4 日後に、コロニー数を観察した。*fadE17* と *hsaD* は野生型、変異型共にほぼ同数の多くのコロニーが観察された。*fadD25* と *fadB3* は変異型プラスミドが大量のコロニーが観察されたが、野生型プラスミドではコロニーは観察できなかった。一方、*kdtB* では、逆に変異型プラスミド導入菌でコロニーが見られず、野生型で大量のコロニーが観察された。また、菌の分裂に関連する *ftsQ* では、野生型と変異型のプラスミド共に、この時点ではコロニーの形成は見られなかった。更に 4 日後 (エレクトロポレーション後 8 日目) の観察では、4 日目で観察できなかったプレートすべてで少量のコロニーが観察できた。つまり、遺伝子発現プラスミドでの導入で形質転換の効率と菌の増殖速度が低下していることがわかった。また、*ftsQ* では野生型と変異型共に、この時点で大量のコロニーが観察されたことから、この遺伝子の過剰発現で菌の増殖が非常に遅くなることがわかった。

M. bovis BCG での形質転換についても、同様にエレクトロポレーションから 3 週間後、さらに 3 週間培養（形質転換から 6 週間後）して観察を行った。BCG では、コロニー形成までに時間がかかったが、各プラスミドの野生型と変異型における形質転換効率やコロニー数などは、*M. smegmatis* の場合と同じであった。

D. 考察

本研究の対象とした結核菌は、疫学調査及び IS6110 RFLP 法による型別分析で同一パターンとなり、集団感染例と推定された例である。結核菌株の系統は、ヨーロッパや米国などで世界的に広まっている北京型新興型株であり、日本国内で主要な遺伝型である北京型祖先型株ではなかった。また、本株は、結核菌進化の主要経路から外れた RD150 欠損株で日本国内では出現頻度が非常に低い系統の結核菌だった。

家族内感染事例で、高頻度変化部位 (HV) 領域の VNTR のコピー数が異なる例が報告されている。本例の 4 株でも IS6110 RFLP パターンは同一、35 箇所 VNTR プロファイルは同じであるが、出張先の同僚から分離された 1 株の HV 領域の VNTR-3232 だけがコピー数が異なった。VNTR 法による型別では分析ローカス数やその選択によって識別能が大きく異なることが知られている。HV 領域を加えることで VNTR 分析の識別能は高くなるが、1 箇所だけの違いで非関連株と判断することはできないため、型別結果の解釈が難しくなると考えられる。そこで、もっと確実に型別できる方法として NGS 分析が、最近注目されてきた。

結核菌が増殖する際、ゲノム上に変異

(SNP) が入り、その変異が継代され時間経過に伴って蓄積していく。NGS によるゲノム解析の結果、Index case と S-1 は H37Rv に比べて 5 箇所の SNP、さらに M-1 間で 1 箇所の SNP が存在したことから、Index case から最初に S-1 にその後 M-1 へ、ほぼ同時期に感染が生じたものと推定される。他方、出張先の同僚 (T-1) から分離された結核菌は、家族内感染株で見られた 6 種類の SNP は持っていなかった。ゲノム上に存在する SNP 数で Index case、M-1、S-1 及び T-1 を遺伝系統的に並べると、変化度合いが低い (H37Rv に遺伝的に近い) ものから順に T-1、Index case = S-1、M-1 となる (図 3)。つまり、遺伝系統上 T-1 から Index case へ変化することは考えられるが、疫学調査から推定されている Index case から T-1 へ結核菌の変化は起こらないと考えられる。このように、本事例は SNP から推定される菌の遺伝系統進化状態と接触者調査による疫学情報が一致しない例であった。ゲノム上の変異 (SNP) は、菌の増殖に伴い発生する。ヒトからヒトへの感染においてどの段階で変異が生じているのか、例えば、1) Index case の体内で微小変化した複数株が存在し、それらが他のヒトへの感染に関与する、2) 体外で浮遊している際に変異が生じる、3) 2 次感染者の体内で変異が生じるなどが考えられるが、未だに詳細は明らかになっていない。今後、同様なケースの分析を進めることでこれらのメカニズムが解明されると考えられる。

日本全国に広まっている M 株の非同義置換 SNP が存在する 41 種類の遺伝子が、M 株の特徴的な表現型であるヒトからヒトへの感染性に関与している可能性がある

と考えられる。そのため、各遺伝子の過剰発現で菌の表現型が変化するかどうか調べた。その結果、以下のように対象遺伝子は、3つのグループに別けることができた。1) BCG 由来遺伝子 (野生型) プラスミド導入株に比べて M 株の非同義置換 SNP を持つ遺伝子 (変異型) プラスミド導入株のコロニー数が多かった遺伝子: *fadD25* と *fadB3*、2) 変異型遺伝子導入株に比べて野生型遺伝子導入株の方が、コロニー数が多かった遺伝子: *kdtB*、3) コロニー形成に SNP が関与しなかった遺伝子: *fadE17*、*ftsQ*、*hsaD* であった。細胞壁に存在する脂肪酸の合成に関与する *fadD25* と *fadB3* や内部代謝に関与する *kdtB* が SNP 有り無しの遺伝子を過剰発現させることで、形質転換の効率や菌の増殖に影響が出たことから菌の表現型に関わっている可能性が示唆された。この点は、再現性等検討する必要がある。

E. 結論

集団感染事例と確認された株の LSP、スポリゴタイピング、VNTR 及び NGS によるゲノム解析を行った。VNTR 分析ではローカスによって、コピー数変化頻度が異なり HV 領域のローカスでは家族内感染事例でも異なることが確認できた。また、NGS を使ったゲノム解析によって得られた SNP の有無で推定された結核菌の遺伝的な進化状態と疫学調査結果が一致しない例があることから、これら両方の結果を総合的に判断して株間の関連と感染経路を検討する必要がある。また、日本全国に広まっていることが判明している結核菌 M 株は、ヒトからヒトへの感染性が高く、ゲノム構造変化もほとんどなく安定であると推定される。

このような M 株の持つ SNP の内、アミノ酸変化が伴う非同義置換 SNP を持つ遺伝子に注目して 6 種類の遺伝子の過剰発現実験を行った。実際に 3 種類の遺伝子は、SNP が存在しアミノ酸が変化すると形質転換効率や菌の増殖に影響があることが判明した。今後、この再現性とメカニズムを検討する必要がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

(1) 論文発表

1. Yamada H, Bhatt A, Danev R, Fujiwara N, Maeda S, Mitarai S, Chikamatsu K, Aono A, Nitta K, Jacobs WR Jr, Nagayama K: Non-acid-fastness in *Mycobacterium tuberculosis* Δ KasB mutant correlates with the cell envelope electron density. *Tuberculosis*, 2012, 92: 351-357.
2. Wada T, Maeda S: Multiplex agarose gel electrophoresis system for variable number of tandem repeats genotyping: analysis example using *Mycobacterium tuberculosis*. *Electrophoresis*. 2013, 34: 1171-1174.
3. Fujikawa A, Fujii T, Mimura S, Takahashi R, Sakai M, Suzuki S, Kyoto Y, Uwabe Y, Maeda S, Mori T: Tuberculosis contact investigation using interferon-gamma release assay with chest x-ray and computed tomography. *PLoS One*. 2014, 9: e85612.
4. Matsumoto T, Suzuki M, Iinuma Y, Maeda S, Ano H, Koshii Y, Murakawa T, Suzuki K, Hoshino Y: A molecular typing methodology of *Mycobacterium tuberculosis* using small

genomic islet patterns (TB-SGIP): A novel genotyping methodology to discriminate clinical strains between Beijing family and T3-OSAKA, *J Infect Dis Ther.* 2014, 2: 35-45.

5. Wada T, Iwamoto T, Tamaru A, Seto J, Ahiko T, Yamamoto K, Hase A, Maeda S, Yamamoto T: Clonality and Micro-Diversity of a Nationwide Spreading Genotype of *Mycobacterium tuberculosis* in Japan. *PLoS One.* 2015, 10: e0118495.

6. Merker M, Blin C, Mona S, Duforet-Frebourg N, Lecher S, Willery E, Blum MG, Rüscher-Gerdes S, Mokrousov I, Aleksic E, Allix-Béguec C, Antierens A, Augustynowicz-Kopeć E, Ballif M, Barletta F, Beck HP, Barry CE 3rd, Bonnet M, Borroni E, Campos-Herrero I, Cirillo D, Cox H, Crowe S, Crudu V, Diel R, Drobniewski F, Fauville-Dufaux M, Gagneux S, Ghebremichael S, Hanekom M, Hoffner S, Jiao WW, Kalon S, Kohl TA, Kontsevaya I, Lillebæk T, Maeda S, Nikolayevskyy V, Rasmussen M, Rastogi N, Samper S, Sanchez-Padilla E, Savic B, Shamputa IC, Shen A, Sng LH, Stakenas P, Toit K, Varaine F, Vukovic D, Wahl C, Warren R, Supply P, Niemann S, Wirth T: Evolutionary history and global spread of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing lineage. *Nat Genet.* 2015, 47: 242-9.

(2) 学会発表

1. 前田伸司、和田崇之：反復配列多型分析法による型別結果比較の際の問題点とその対策. 第87回 日本結核病学会、2012、広島

2. 藤原永年、中崇、前田伸司、柴田満、仁

木満美子、大原直也、前山順一、矢野郁也、山本三郎：BCG Tokyo 172 type I, II 株の形態及び脂質分子の分布と機能. 第87回 日本結核病学会、2012、広島

3. Mitsuru Shibata, Takashi Naka, Shinji Maeda, Hisashi Ogura, Nagatoshi Fujiwara : Production and Characterization of Polyclonal Rabbit Antibodies to Mycobacterial Lipid Antigens. 112th General Meeting, American Society for Microbiology 2012, San Francisco, USA

4. Shinji Maeda, Noboru Nakata, Takashi Naka, Masanori Kai, Nagatoshi Fujiwara : Isolation and Characterization of the Phosphatidylserine Synthetase Knock-out Mutants of Mycobacteria. 112th General Meeting, American Society for Microbiology 2012, San Francisco, USA

5. Takashi Naka, Shinji Maeda, Mamiko Niki, Naoya Ohara, Saburo Yamamoto, Ikuya Yano, Jun-ichi Maeyama, Hisashi Ogura, Kazuo Kobayashi, Mitsuru Shibata, Nagatoshi Fujiwara : Lipid Phenotypes of Two Distinct Subpopulations of *Mycobacterium bovis* *Bacillus Calmette-Guérin* Tokyo 172 Substrain and their Host Responses. 112th General Meeting, American Society for Microbiology 2012, San Francisco, USA

6. 前田伸司、中崇、藤原永年：反復配列多型 (VNTR) 分析を利用した結核菌群の同定と型別. 第86回 日本細菌学会、2013、千葉

7. 藤原永年、中崇、柴田満、前田伸司：抗酸菌における形態、宿主応答と連関した脂質生化学的一考察. 第88回 日本結核病学会、2013、千葉

8. 山田博之、前田伸司、近松絹代、青野昭男、御手洗聡：電子顕微鏡を用いた結核菌の形態計測標準データの試行. 第88回 日本結核病学会、2013、千葉
9. 前田伸司、櫻田紳策、小林信之、慶長直人：日本国内とベトナム（ハノイ地区）で分離された結核菌における遺伝系統の比較. 第88回 日本結核病学会、2013、千葉
10. Shinji Maeda, Takayuki Wada, Takashi Naka, Mitsuru Shibata, Nagatoshi Fujiwara: Genotyping of *Mycobacterium tuberculosis*, especially Beijing genotype MTB, in Japan by using the variable-number of tandem repeats (VNTR) and a next generation sequencer. 5th EMBO meeting. 2013, Amsterdam.
11. 和田崇之、岩本朋忠、前田伸司、長谷篤、山本太郎：結核菌における遺伝型別一致株の比較ゲノム解析. 第87回 日本細菌学会、2014. 東京
12. 大原直也、趙娜、和田崇之、藤原永年、前田伸司、山本三郎、瀧井猛将、前山順一：BCG Tokyo172-1に存在するサブポピュレーションの比率変化に関する検討：第89回 日本結核病学会、2014. 岐阜
13. 前田伸司、櫻田紳策、小林信之、慶長直人：ベトナムハノイ地区で分離された結核菌の反復配列多型（VNTR）分析法を利用した分子疫学：第89回 日本結核病学会、2014. 岐阜
14. 村瀬良朗、大角晃弘、内村和広、前田伸司、石川信克：都市部における外国人結核の感染動態に関する分子疫学研究：第89回 日本結核病学会、2014. 岐阜
15. 藤原永年、和田崇之、前田伸司：超高分解能MALDI Spiral-TOFMSによるミコール酸の簡易迅速分析法の開発：第89回 日本結核病学会、2014. 岐阜
16. 土方美奈子、松下育美、前田伸司、櫻田紳策、慶長直人：ベトナムにおけるマンノース結合レクチン（MBL）遺伝子多型と結核の関連：第89回 日本結核病学会、2014. 岐阜
17. 和田崇之、岩本朋忠、瀬戸順次、田丸亜紀、長谷篤、前田伸司、阿彦忠之、山本太郎：M株の広域的分離の原因究明—比較ゲノム解析に基づく「結核ゲノム疫学」の導入：第89回 日本結核病学会、2014. 岐阜
18. Shinji Maeda, Noboru Nakata, Takashi Naka, Nagatoshi Fujiwara: Isolation of mycobacterial mutants that disrupted the phospholipid synthetase gene, and their properties. FEBS EMBO 2014 Conference (Palais des Congrès), 2014, Paris, France.
19. 慶長直人、前田伸司、櫻田紳策、土方美奈子：ベトナムハノイ市で検出される結核菌の臨床疫学的特徴について：第90回 日本結核病学会、2015. 長崎
20. 松本智成、前田伸司、星野仁彦：Small genomic islandの有無による新規結核菌遺伝子型別解析 TB-SGIPの開発：第90回 日本結核病学会、2015. 長崎
21. 村瀬良朗、大角晃弘、渡部裕之、内村和広、神楽岡澄、窪田ゆか、榊原麻里絵、前田伸司、石川信克：感染経路の推定に難渋した集団発生事例における結核菌全ゲノム解析の活用：第90回 日本結核病学会、2015. 長崎
22. 柴田満、前田伸司、藤原永年：結核菌由来脂質抗原の家兔免疫による抗脂質IgG抗体の産生とその性質：第90回 日本結核病学会、2015. 長崎
23. 前田伸司、和田崇之、櫻田紳策、小林

信之、慶長直人：ベトナムハノイ地区で分離された結核菌の分子疫学解析：第90回 日本結核病学会、2015. 長崎

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

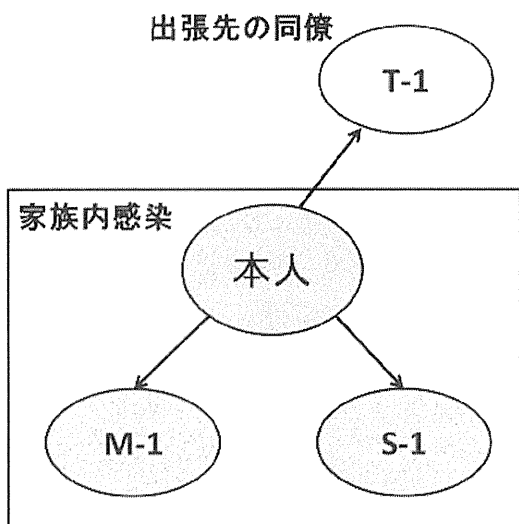


図 1. 疫学調査から推定された結核の感染経路

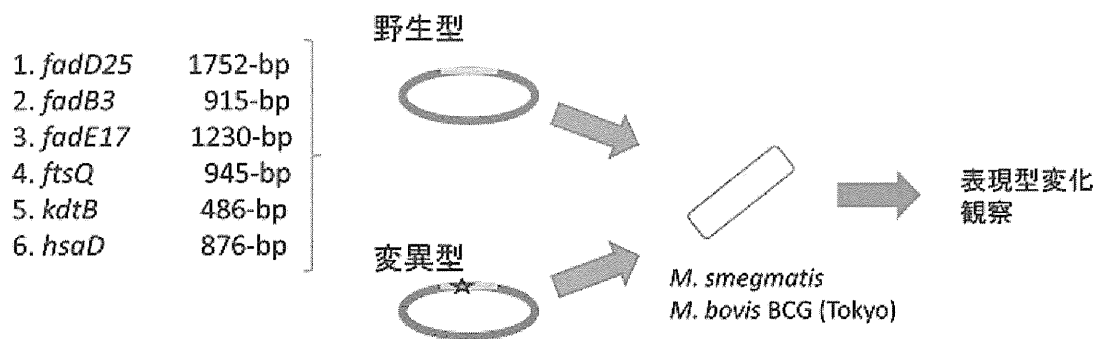


図 2. 6 種類の遺伝子に関してそれぞれ野生型と変異型を抗酸菌に導入して菌の表現型変化を観察

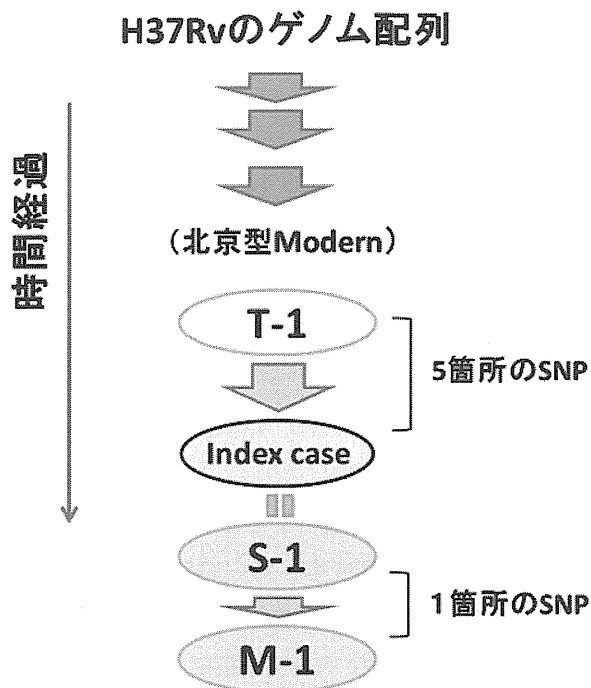


図 3. 全ゲノム比較から推定された結核菌の系統進化

NGS 分析で得られた SNP の有無から考えられる関連する結核菌の系統進化

厚生労働省科学研究費補助金新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業
(新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業)
(総合) 分担研究報告書

結核菌株の遺伝背景と臨床・疫学・細菌学的特徴との関連性の解明

研究分担者 岩本 朋忠 (神戸市環境保健研究所・感染症部・副部長)

研究要旨

結核は、多彩な疫学像、臨床像を呈しており、その根源を知るためには、結核菌ゲノムの多様性に関する理解が不可欠である。本研究では、大阪湾岸地域での多剤耐性結核菌の市中感染の現状を明らかにし、その背景と感染拡大のリスクを結核菌のゲノム情報に基づき解析することを目的とした。

大阪湾岸地域においては、多剤・超多剤耐性結核菌のクラスター形成率が高く (35.6%)、活発な感染伝播が起こっているものと思われる。その要因の一つとして、補填的変異を保有する株、すなわち、生存能力を高めた耐性菌が高率に存在することが示された。網羅的な VNTR 解析により、地域内感染拡大株 (補填的変異を有する L527V 型株) が検知され、そのクローン性の高さがゲノム解析により確認された。多剤・超多剤耐性結核菌が広域に感染拡大するリスクは無視できないことを明らかにしたといえる。さらに、今後、L527V 型株を簡便かつ迅速にモニタリングできる遺伝子マーカーとして、intergenic 領域上の変異(ゲノム上の 3067988 番目の塩基の T から G への変異)を特定した。

今回、我々は、網羅的な遺伝型別解析による感染拡大株 (L527V 型株) の検知、ゲノム解析による感染様式の精密解析、そして、L527V 型株のモニタリングに活用できる変異の特定 (ゲノムポジション 3067988 の変異) を環として繋げた研究成果を得た。今後、特定の菌株の広域拡散を監視する体制を構築する上での、貴重な成功モデルとして、意義深いものといえる。

研究協力者

吉田 志緒美

(近畿中央胸部疾患センター)

A. 研究目的

多剤耐性結核菌の市中感染の現状を明らかにし、その背景と感染拡大のリスクを結核菌のゲノム情報に基づき解析することを目的とした。本研究により、多剤耐性結核菌の潜在的な感染拡大能力を解明し、即効性を持った公衆衛生上の対策への展開を目指したい。

B. 研究方法

1. 解析対象株 :

大阪湾岸地域で 2001-2013 年に分離された、多剤耐性結核菌 177 株(超多剤耐性結核菌 57 株を含む)、リファンピシン単独耐性結核菌 17 株。

2. 遺伝型別解析

我が国で優占する、結核菌北京型株の遺伝子型別に最適化した 24 領域を用いた VNTR 解析を行った。各菌株の VNTR パターンに基づき、菌株間の遺伝的関連性を minimum spanning tree (MST) を用いて、視覚化した。

3. 遺伝子変異解析

リファンピシン耐性関連遺伝子である *rpoB* のホットスポット領域 81bp (RRDR) の塩基配列を解析し、リファンピシン耐性関連変異を検出した。薬剤耐性化による生存能力の低下を補填する変異として、*rpoA*、*rpoC* 遺伝子の変異に着目し、*rpoA* 遺伝子の全長 (1041bp) と *rpoC* 遺伝子の RpoA-RpoC interaction area を含むアミノ酸ポジション 224-868 の塩基配列 (1935bp) を解読した。

4. 全ゲノム解析

イルミナ社の HiSeq を用いて、全ゲノム領域の数百倍に相当する配列情報を取得した。結核菌 H37Rv 株のゲノム塩基配列を参照配列とした全ゲノムマッピング解析によって点置換変異を検出した。

5. 感染拡大株 (L527V 型株) の比較ゲノム解析

VNTR 解析により拡張型のクラスター形成を認めた感染拡大株(L527V 型株) 11 株について全ゲノムマッピング解析を行い、各株の点置換変異を決定した。得られた点置換変異情報を菌株間で比較し、各菌株間の異同性を 1 塩基レベルの解像度で判定した。

6. 感染拡大株 (L527V 型株) に固有な変異の特定

L527V 型株に固有な変異は、他の株と区別する場合の遺伝子マーカーとして有用である。特定の菌株に固有の変異を特定するには、出来る限り直近の共通祖先から分岐した株との比較ゲノム解析を行う必要がある。この目的に最適な株として、我々は、L527V 型株と RFLP パターンが一致し、24 領域の VNTR 解析で 1 ローカス違いをみとめ、さらに *rpoC* の変異ポジションが異なる株 (G332S 型株と命名) を特定し、比較ゲノム解析に用いた。

7. 超近接ゲノム比較。

L527V 型株(11 株)と G332S 型株(2 株)の全ゲノム解析データを用いて、超近接ゲノム比較を行い、各株固有の変異を特定した。各株固有の変異を連結し、PopART を用いて Median Joining Network tree を描写した。

(倫理面への配慮)

本研究に用いた菌株は全て番号化することで、個人情報の特定が不可能となるように配慮した(連結不可能匿名化)。

C. 研究結果

多剤耐性結核菌の遺伝子型別解析

図 1 に、大阪湾岸地域における多剤耐性結核菌の VNTR パターンに基づく MST を示した。クラスター形成率は 35.6% であり、感受性株と同程度に、市中での感染伝搬が起きているものと思われる。特に、超多剤耐性結核菌で、高いクラスター形成率を認めた (57.9%)。また、クラスターサイズが 13 の遺伝子型、9 の遺伝子型がそれぞれ 1 タイプ検出された。特定のクローンの活発な感染伝搬を示唆するものである。

補填的変異の検出

多剤耐性結核菌で認められた高いクラスター形成率の細菌学的背景を推察するために、薬剤耐性化(リファンピシン耐性化)の代償である生物的負荷(生存能力の低下)を軽減する遺伝子変異 (補填的変異)として知られている *rpoA*、*rpoC* 変異の検出を行った。解析した 194 株のうち 93 株で、*rpoA* あるいは *rpoC* 遺伝子に変異が認められた。これらの変異から、補填的変異ではないもの、すなわち、同義置換変異、遺伝系統を支持する変異、同一あるいは類似の VNTR 遺伝子型を示す感受性株で検出される

変異を除き、補填的変異保有株とその変異の種類を確定した。その結果、70株が補填的変異を保有し(36%, 70/196)、そのアミノ酸置換の種類は、35種類であった。これらのアミノ酸置換とリファンピシン耐性関連変異 (*rpoB* 上のRRDR 領域)との関連性を調べたところ、補填的変異の出現は、*rpoB* コドン 531 での変異と強い相関が認められた(表 1)。

次に、補填的変異の保有とクラスター形成株の割合を調べたところ、変異を保有する株では 48.6%、変異を持たない株では 28.2%であり、補填的変異を持つ株で感染伝搬が、より活発に起こっていることが分かった(図 2)。最大クラスター形成株(13株)と、その類似 VNTR パターン株6株中の3株は、すべて同じ *rpoC* 変異(コドン 527 の L から V への変異)を有しており、単一クローン由来株の感染拡大であることが示唆された(図 2)。一方、その他の類似 VNTR パターン株3株は、*rpoC* 変異(コドン 332 の G から S への変異)が一致しており、最大クラスター形成株とは異なるクローンによる感染伝搬であることが示唆された(図 2)。コドン 527 の L から V への変異を持つ16株を感染拡大株として、L527V 型株と呼ぶことにした。また、その類似 VNTR パターンであり、異なる *rpoC* 変異を持つ株を G332S 型株とした。

感染拡大型株の比較ゲノム解析

L527V 型株 16 株のうち 11 株、G332S 型株 3 株のうち 2 株について、全ゲノムマッピング解析を行い、各型に属する菌株間での変異の有無を比較した(図 3)。L527V 型株に固有の変異が 13 か所、G332S 型株に固有の変異が 18 か所検出された。共通祖先からの分岐を示すものであり、両菌型の遺伝的関連性は極めて高いものの、それぞれに独立して、感染伝搬してきたことを

強く支持する結果である。

一方、同一型に属する菌株間の変異は各グループ内での感染伝搬の実情を反映したものになっていると考えられる。G332S 型株の 2 株は家族内感染事例であり、Fa 株が新たに獲得した 2 か所の変異は、この伝播を反映したものといえる。L527V 型株の 11 株の近接ゲノム比較からは、図 3 に示した A, B, C の 3 つの感染拡大イベントの存在が示唆された。すなわち、変異の出現様式から、1) 全 11 株の共通祖先となり得る A の時点での株の拡散、2) 2 か所の変異を共有した 5 株 (k28, k66_2007, k23, k45, k19) が拡散した B、3) 1 箇所の変異を共有した 3 株 (k78, New35, kb193) が拡散した C の時点の合計 3 つのイベントが再構築できたと言える。また、B, C においては、さらに微小なレベルでの変異の共有が各 1 組の株間で (k45 と k23, k78 と New35) 認められた。直近での感染伝搬を強く示唆するものである。

VNTR 型別には偶発的変異により、同一クローン由来にもかかわらず異なる株と判断される場合がある。L527V 型株に属する kb193 株がその例といえる。逆に、1 領域変異を許容して同一型別と判断した場合、本来異なるクローン由来株を同一株と判断する危険性がある。L527V 型株と G332S 型株の場合が、この例に当てはまる。このような、VNTR 型別の不確かさを補填できるのが、菌株固有の変異情報の活用である。今回のゲノム解析により、L527V 型株に固有の変異が 13 か所特定できた(表 2)。これらの変異の一つは、*intergenic* 領域にあり(ゲノム上の 3067988 番目の塩基の T から G への変異)、今後、L527V 型株の発生動向を簡便かつ迅速にモニタリングできる遺伝子マーカーとして活用できる。

D. 考察

大阪湾岸地域で分離された多剤耐性結核菌を網羅的に VNTR 解析したところ、クラスター形成率は感受性株とほぼ同程度の 35.6%であることが分かった(図 1)。地域内での感染伝搬が活発に起こっているものと思われる。薬剤耐性化による生存能力の低下を補填する、補填的変異の保有株の割合は 36%を占めており、地域内での感染伝播を引き起こす要因の一つと考えられた(表 1、図 2)。さらに、補填的変異を有する特定の遺伝子型株が高頻度に検出された。感染拡大株であり、公衆衛生上の警戒が必要と思われる。我々は、この株を L527V 型株と名付け、比較ゲノム解析を行うことで、より詳細な菌株間の違いを明らかにするとともに、過去における複数の感染拡大イベントの発生と、現在への影響を推察した(図 3)。比較ゲノム解析により、L527V 型株の遺伝的均質性は極めて高く、巨大クラスターの形成は、単クローンによる感染伝搬の結果であることが強く示唆された。また、過去において、少なくとも 3 回の感染拡大イベントが発生したものと推察された。さらに、L527V 型株に共通の固有変異や細分類に有効となる菌株固有変異を特定した。このような変異は、L527V 型株の発生動向を高精度にモニタリングするための遺伝子マーカーとして、有効利用できるものである。

本研究により、本邦で分離される多剤耐性結核菌は、潜在的に感染拡大を引き起しやすい遺伝的背景を持つことが示唆された。多剤・超多剤耐性結核菌は、公衆衛生上最も警戒を要するものであり、即効性を持った対策が求められる。そのためには、現在の行政の枠組みを超えた広域での連携による、多剤耐性結核菌の広域感染拡大の実態解明が必須といえる。今回、我々は、網羅的な遺伝子型別解析による感染拡

大株の検知(補填的変異を有する L527V 型株)、ゲノム解析による感染様式の精密解析(菌株の均質性の確定と感染拡大イベントの推定)、そして、L527V 型株のモニタリングに活用できる変異の特定(ゲノムポジション 3067988 の変異)を環として繋げた研究成果を得た。特定の菌株の広域拡散を監視する体制を構築する上での、貴重な成功モデルとして、意義深い研究成果といえる。

E. 結論

大阪湾岸地域においては、多剤・超多剤耐性結核菌のクラスター形成率は高く、活発な感染伝播が起こっているものと思われる。その要因の一つとして、補填的変異保有株、すなわち、生存能力を高めた耐性菌が高率に存在することが示された。網羅的な VNTR 解析により、地域内感染拡大株(L527V 型株)が検知され、そのクローン性の高さはゲノム解析により確認された。多剤・超多剤耐性結核菌が広域に感染拡大するリスクは無視できないことを明らかにしたといえる。さらに、今後、L527V 型株を簡便かつ迅速にモニタリングできる遺伝子マーカーとして、intergenic 領域上の変異(ゲノム上の 3067988 番目の塩基の T から G への変異)を特定した。

本研究は、VNTR 解析による網羅的な遺伝子型別解析とゲノム解析による菌株の精密解析、そして、特定の菌株を簡便かつ迅速にモニタリングできる変異の検出を環として繋げたものである。今後、特定の菌株の広域拡散を監視する体制を構築する上での、貴重な成功モデルとして、意義深いものとなるであろう。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Iwamoto T, Grandjean L, Arikawa K, Nakanishi N, Caviedes L, Coronel J, Sheen P, Wada T, Taype CA, Shaw MA, Moore D.A.J, and Robert H. Gilman R.H. Genetic diversity and transmission characteristics of Beijing family strains of *Mycobacterium tuberculosis* in Peru. PLoS ONE 7(11):e49651, 2012
- 2) Nakanishi N, Wada T, Arikawa K, Millet J, Rastogi N, and Iwamoto T. Evolutionary robust SNPs reveal the misclassification of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing family strains into sublineages. Infect. Genet. Evol. 16:174-177, 2013
- 3) Nakajima C, Tamaru A, Rahim Z, Poudel A, Maharjian B, Aye KS, Ling H, Hattori T, Iwamoto T, Fukushima Y, Suzuku H, Suzuki Y and Matsuba T. Simple multiplex PCR assay for identification of Beijing family *Mycobacterium tuberculosis* isolates with a lineage-specific mutation in Rv0679c. J. Clin. Microbiol. 51:2025-2032, 2013
- 4) Iwamoto T, Arikawa K, Nakajima C, Nakanishi N, Nichiuchi Y, Yoshida S, Tamaru A, Tamura Y, Hoshino H, Yoo H, Park YK, Saito H and Suzuki Y. Intra-subspecies sequence variability of the MACPPE12 gene in *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis*. Infect. Genet. Evol. 21:479-83, 2014
- 5) Wada T, Iwamoto T, Tamaru A, Seto J, Ahiko T, Yamamoto K, Hase A, Maeda S, Yamamoto T. Clonality and micro-diversity of a nationwide spreading genotype of *Mycobacterium tuberculosis* in Japan. PLoS ONE 10:e0118495, 2015

- 6) Barletta F, Otero L, de Jong B, Iwamoto T, Arikawa K, Van der Stuyft P, Niemann S, Merker M, Uwizeye C, Seas C, and Rigouts L. Predominant *Mycobacterium tuberculosis* families and high rate of transmission among new cases are not associated with primary multidrug resistance in Lima. J. Clin. Microbiol. (in press)
- 7) Grandjean L, Iwamoto T, Lithgow A, Gilman R.H., Arikawa K, Nakanishi N, Martin L, Castillo E, Alarcon V, Coronel J, Solano W, Aminian M, Guezala C, Rastogi N, Couvin D, Sheen P, Zimic M, Moore D. The association between *Mycobacterium tuberculosis* genotype and drug resistance in Peru. PLoS ONE (in press)

2. 学会発表

- 1) Iwamoto T, Grandjean L, Arikawa K, Nakanishi N, Coronel J, Caviedes L, Sheen P, Wada T, Taype C, Shaw MA, Moore D.A.J, Gilman R.H. Genetic diversity of Beijing family strains of *Mycobacterium tuberculosis* in Peru compared with that of strains from East Asia
11 th International Conference on Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics of Infectious Diseases, October 30 – November 2, 2012, New Orleans, USA
- 2) 中西典子、和田崇之、有川健太郎、岩本朋忠. 結核菌北京型 1,054 株を用いた遺伝的系統解析法の評価. 第 86 回日本細菌学会総会、2013 年 3 月 18-20 日、幕張メッセ 千葉
- 3) 岩本朋忠、有川健太郎、中西典子、藤山理世、松林恵介、山下真理子、水尻節子、白井千香、伊地智昭浩
結核分子疫学への新技術「次世代シーケンサー」

活用の基礎的検討

第 111 回日本結核病学会 近畿地方会、2013 年 7 月 13 日、大阪

4) 有川健太郎、中西典子、岩本朋忠、藤山理世、松林恵介、山下真理子、水尻節子、白井千香、伊地智昭浩. 神戸市における外国人結核の分子疫学. 第 111 回日本結核病学会 近畿地方会、2013 年 7 月 13 日、大阪

5) 岩本朋忠、有川健太郎、吉田志緒美、露口一成、鈴木克洋. BCG ワクチン接種副反応事例から得た BCG Tokyo 172-1 株に生じた遺伝子変異の検出. 第 44 回 結核・非定型抗酸菌症治療研究会、2013 年 12 月 8 日、東京

6) 岩本朋忠、有川健太郎、中西典子、瀧井猛将. ワクチン接種副反応患者の生体内で起こった BCG Tokyo 172 株の微小進化. 第 87 回 日本細菌学会総会、2014 年 3 月 26-28 日、東京

7) 有川健太郎、中西典子、岩本朋忠. 結核菌分子疫学による地域内蔓延株の網羅的解析ならびに外国人結核との比較. 第 87 回 日本細菌学会総会、2014 年 3 月 26-28 日、東京

8) 岩本朋忠、有川健太郎、藤山理世、松林恵介、水尻節子、白井千香、伊地智昭浩. BCG ワクチン接種副反応事例から得た BCG Tokyo 172 株の遺伝子変異. 第 89 回 日本結核病学会総会、2014 年 5 月 9-10 日、岐阜

9) 藤山理世、松林恵介、水尻節子、白井千香、伊地智昭浩、有川健太郎、岩本朋忠、鈴木克洋、岡田全司、坂谷光則、若林一郎. 神戸市において 60 代・70 代を含む集団に実施した QFT 検査の結果について. 第 89 回 日本結核病学会総会、2014 年 5 月 9-10 日、岐阜

10) 和田崇之、岩本朋忠、瀬戸順次、田丸亜貴、長谷篤、前田伸司、阿彦忠之、山本太郎. M 株の広域的分離の原因究明 - 比較ゲノム解析に基づく「結核ゲノム疫学」の導入. 第 89 回 日本

結核病学会総会、2014 年 5 月 9-10 日、岐阜

11) 有川健太郎、中西典子、岩本朋忠、藤山理世、松林恵介、水尻節子、白井千香、伊地智昭浩. 結核菌分子疫学による神戸市内蔓延株の網羅的解析ならびに外国人結核との比較. 第 89 回 日本結核病学会総会、2014 年 5 月 9-10 日、岐阜

12) 岩本朋忠. 都市型結核分子疫学へのゲノム解析の活用. 第 19 回 国際結核セミナー、2015 年 3 月 5 日、東京

13) 有川健太郎、吉田志緒美、岩本朋忠. 多剤耐性結核菌の二次変異保有状況の解析. 第 88 回 日本細菌学会総会、2015 年 3 月 26-28 日、岐阜

14) 瀧井猛将、吉田志緒美、有川健太郎、藤山理世、岩本朋忠. BCG 副反応事例株における遺伝子変異と宿主細胞に対する作用の解析. 第 90 回 日本結核病学会総会、2015 年 3 月 27-28 日、長崎

知的財産権の出願・登録状況

なし

表 1. 補填的変異とリファンピシン耐性関連遺伝子との関連性

<i>rpoB</i> アミノ酸変異箇所	WT	513	516	526	531	その他
全株数	8	5	25	40	98	18
補償的変異なし株数	8	4	25	32	41	15
<i>rpoC</i> 変異箇所(株数)		G332S(1)		M312V(1) G388R(1) I509V(1) S561P(2) N698D(1)	A230V(2) G332D(1) G332S(6) G395R(2) N416S(1) N416T(1) V483A(1) V483G(2) W484G(1) I491V(2) L507V(1) V517L(2) G519D(2) A521D(4) H525Q(1) L527V(16) K715E(1) D747A(2) D747G(1) L774V(1)	R480C(1) W484G(1)
<i>rpoA</i> 変異箇所(株数)				T15S(1) P102S(1)	T15S(3) G31S(1) V85M(1) V183G(1) R186L(1) T187P(1) H270R(1)	S19Y(1)

* 同一株

表2. L527V型株に固有な一塩基変異

ID	Position in H37Rv	野生型	変異	遺伝子	アミノ酸置換
1	125888	G	A	ctpl	
2	494462	C	T	ackA	
3	764948	T	G	rpoC	Leu527Val
4	1439214	C	T	cysN	Ala103Val
5	1472359	A	C	rrs	
6	1473246	A	G	rrs	
7	1481337	G	A	Rv1319c	Arg389Trp
8	2258133	A	T	vapB15	Asp35Val
9	3067988	T	G		
10	3337303	G	A	ddlA	
11	4016556	A	G	kstR	Thr25Ala
12	4247431	G	C	embB	Met30Ile
13	4296123	T	G	pks2	Lys1161Asn

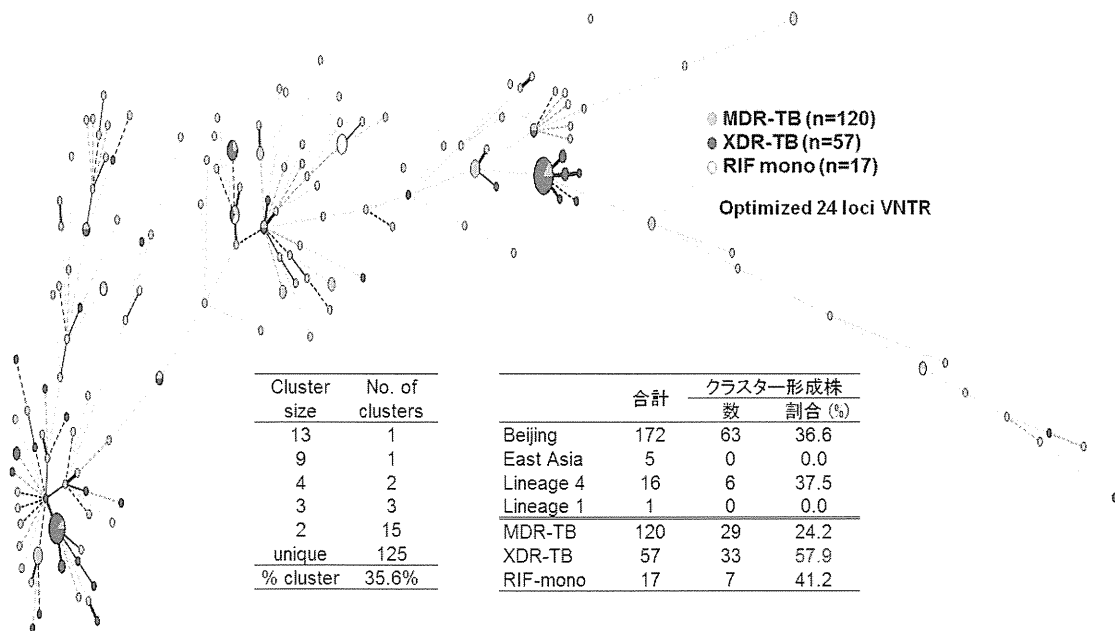


図1. 大阪湾岸地域で分離された結核菌(多剤耐性結核菌 120株、超多剤耐性結核菌57株、リファンピシン単独耐性株 17株)の24_{Beijing} VNTR解析。

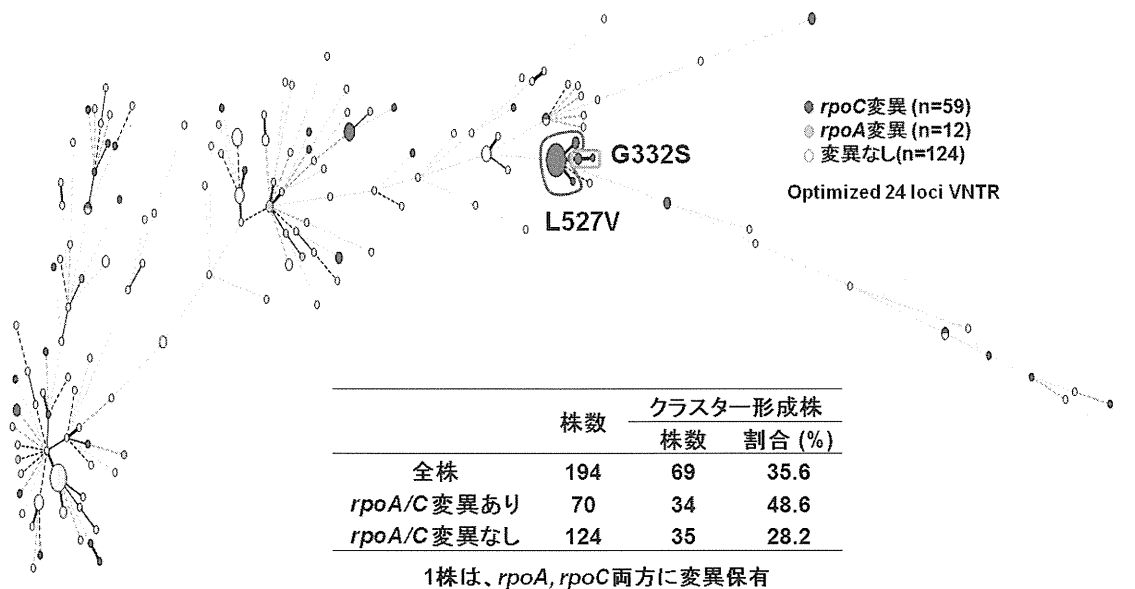


図2. *rpoA*, *rpoC*変異保有株のクラスター形成

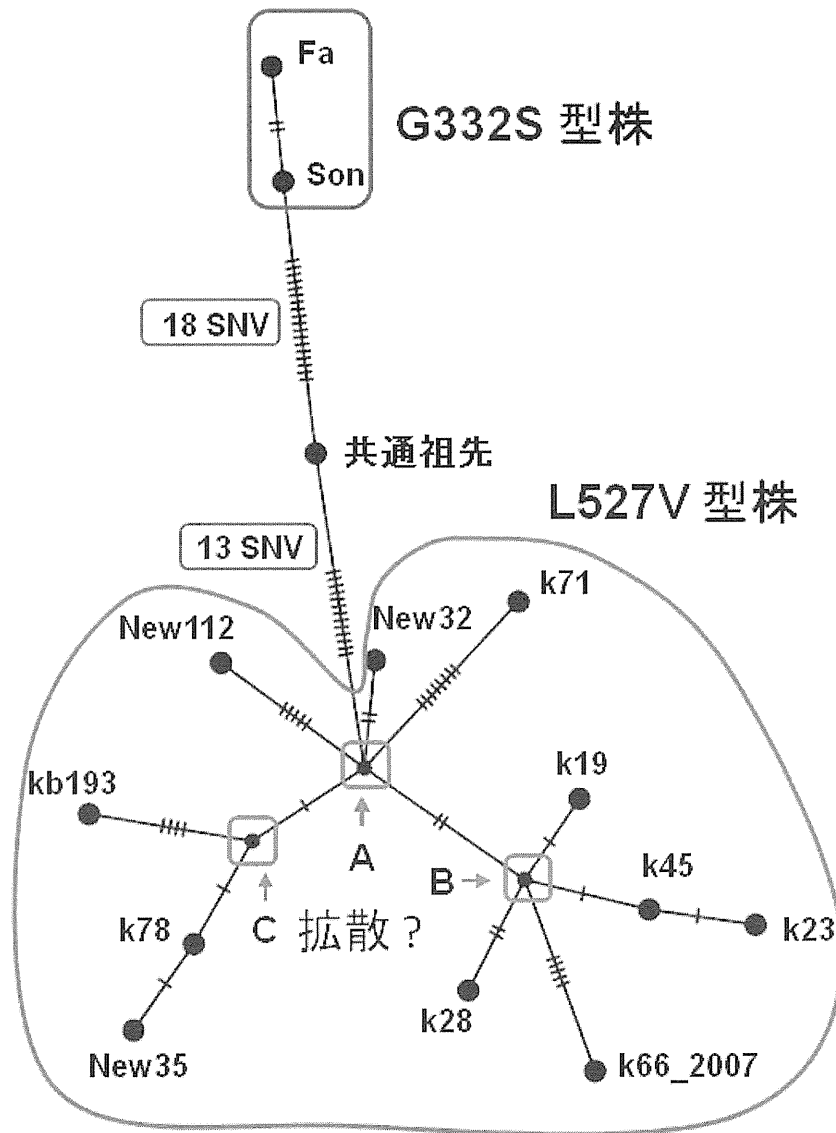


図 3. L527V型株 (11株)とG332S型株 (2株)の超近接ゲノム比較。
各ノード間のバーの数は菌株間の変異数を表す。

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症 研究事業）
（新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業）
（総合）分担研究報告書

多様な研究シーズを想定した結核菌臨床分離株のゲノム情報集積

研究分担者 和田 崇之（長崎大学熱帯医学研究所国際保健学 助教）

研究要旨.

結核菌の臨床分離株には遺伝的多様性があり、各菌株には点変異や遺伝子欠損など、様々な個性がゲノムレベルで存在している。こうした違いは菌株の性質（病原性や抗原性、その他未知の生化学性状など）と密接に関連することから、菌株ゲノム情報を集積することによって結核研究に向けた新しい研究シーズとして活用できる。本課題では、1) 国内株の特異性（祖先型北京株の流行・定着）を系統的に網羅するためのゲノムデータ集積、2) 全国広域のかつ持続的に分離される VNTR 型別一致株（M 株）、3) 低蔓延地域での結核サーベイランスへの応用を対象として、個々の課題におけるゲノムデータの比較とそれに基づく検証、分析を行った。これらの結果は、国内株分析の基礎データを構築するとともに、菌株の詳細な異同判定のためのデータ活用パイプラインの構築、伝搬経路推定や分子疫学的展開への応用など、新しい結核対策を指向したゲノムデータの活用を促すものである。

A. 研究目的

結核患者から分離培養される結核菌の臨床分離株には、遺伝子レベルの多型性がある。遺伝多型解析は、病原性や薬剤耐性との関連性といったような細菌学的研究はもとより、公衆衛生対策において患者間の伝搬経路を推定するための重要な科学的根拠となりうる。

近年、次世代シーケンサー（NGS, Next Generation Sequencer）の技術革新に伴い、結核菌でもゲノム塩基配列全域を対象とした比較ゲノム解析が容易になってきた。比較ゲノム解析では、菌株ごとの遺伝的個性を極めて高精度に分析できるだけでなく、その変異情報を他の菌株と比較して検証す

ることにより、高精度な菌株間異同判定や、株個性の関連遺伝子探索が可能となる。

本研究課題の目的は、臨床分離株のゲノムデータを様々な観点から効率的に蓄積し、我が国における結核菌のゲノム多様性解析の基盤を構築することである。変異情報を共同研究者と共有、公開することにより、様々な結核研究シーズとして役立てると共に、変異検出技術に応用することによって現行の遺伝型別法（VNTR 法）の問題点が解消されることが期待される。具体的には、3 年間を通して以下の3つの目的を設定し、菌株の比較ゲノムデータを分析することとした。

1) 国内株の特異性を系統的に網羅するためのゲノムデータ集積. わが国の結核菌株は東アジア優先系統である北京型株が菌株全体の約8割を占めており、既知の点変異多型 (SNPs) によってさらに6群 (系統発生順に ST11/26, STKr, ST3r, ST19/25, ST10, ST22) に細分類可能である. このうち ST11/26, STKr, ST3r, ST19/25 が祖先型に, ST10, ST22 群が新興型に属しており, わが国では祖先型が優先的に分離される. 一方, 非北京型結核菌では, 「T3-Osaka」と名付けられた菌株群が本邦固有に定着している可能性があり, 祖先型北京株の定着に対する比較対象として重要である. 本課題では, これらの系統群ごとに代表株を選抜し, それらのゲノムデータを効率的に蓄積することで, 我が国における結核菌の遺伝的多様性を効率的に網羅することを目的とした.

2) 広域のかつ持続的に分離される VNTR 型別一致株 (M 株) の異同判定と拡散経路の推定. 単一の遺伝型によって定義される「M株」は, 全国規模かつ長期にわたって継続して分離されることから, 大規模な拡散経路の存在と, 菌側の遺伝的要因による高病原性・高伝播性が懸念されている. そこで本課題では, 日本各地で分離されたM株のゲノムデータから共通の遺伝子変異を調べ, 同株の拡散経緯を推定することを目的とした.

3) 低蔓延地域での結核サーベイランスへの応用. 地域内において不特定多数の患者由来株を収集・分析する結核菌サーベイランスに着目し, VNTR 型別が一致したケース (クラスター) のゲノムデータを比較することにより, 精密な異同判定を試みた. その際, 解析フィールドを低罹患率地域 (山

形県) に設定することにより, 今後わが国で想定される低罹患率化においてゲノム比較解析がどのような知見を与えうるのかを評価できるよう配慮した.

B. 研究方法

ゲノムデータの集積およびマッピング解析. 各菌株を小川培地にて培養後集菌し, ゲノム DNA を精製した. 各株由来 DNA は Illumina 社のシーケンサーを用いて解析し, ショートリード (ペアエンド) を獲得した. リードデータは CLC genomics workbench (QIAGEN 社) を利用して, H37Rv (GenBank: AL123456.2) を参照配列としたマッピング解析を行った. 誤検出を避けるため, 重複遺伝子, 反復領域を除いた遺伝子コーディング領域のみを抽出し, 異同判定に利用した.

分子系統上の代表的な結核菌株のゲノム情報集積. 先行研究で比較ゲノム解析が未実施の小系統群に属する菌株 (16株) をあらかじめ選択し, 分析対象とした.

広域的に分離される菌株 (M 株) のゲノム比較解析. 5 地域 (山形, 東京, 大阪, 神戸, 沖縄) における結核分子疫学サーベイランスで VNTR 型別によって同定された M 株 (7 株) を分析対象とした. 加えて, 接触調査によって家族内伝播が疑われた事例から 2 株, 同一患者から分離された多剤耐性化 1 株を加え, 計 10 株を比較ゲノム対象とした. これらに共通する変異から 1 塩基 (1757565 G->A) を選択して M 株の再定義とし, 同株の検出を簡略化することを試みた.

低罹患率地域における結核菌サーベイランスにおけるゲノム比較. 山形県において

実施された結核分子疫学サーベイランス（瀬戸ら，結核，2013）を対象とした。具体的には，2009-2011年に新規登録された266人中184人から分離された結核菌株において，24領域VNTRのうち23領域が一致した49菌株（17クラスター）を対象とした。各株の変異情報をクラスター内で比較し，菌株間の異同判定に利用した。

倫理面への配慮．本研究に供試された結核菌株は，共同研究者および研究協力者の所属機関において継続的に集積されたものである。各菌株は個人情報特定されないように番号をつけ匿名化し，プライバシーに配慮した。本課題における菌株とその遺伝型別の利用は，未知の結核感染源推定に重要な情報を与えるものであり，感染症法15条および17条により規定される「積極的疫学調査」に適合する。

C. 研究結果

分子系統上における代表株データ．先行研究（Wada et al., Infect Genet Evol. 2012）において，わが国の北京型は大きく5群に細分され，その中でさらに詳細な系統に分岐されることが示されている。本課題では，このおおまかな系統分類に従って，16株を追加解析することにより，同先行研究において見いだされていた系統すべてにわたってゲノムデータを獲得することができた。加えて，非北京型結核菌 T3-Osaka から計3株のゲノムデータが獲得できた。本解析により，国内結核菌の主要系統群はほぼ全体的に網羅されたことになる。

広域的に分離される菌株（M株）のゲノム比較解析．ゲノム比較に供した10株は一致度がきわめて高く，単一の株が短期間に

拡散してきた経緯が推定された。しかし，個々の菌株間には最少でも7か所以上の置換変異が見いだされ，直近の伝播よりも遠い関係が支持された。M株に共通する点変異を1か所選び，遺伝マーカーとしてサーベイランス株（2,410株）を調査したところ，52株に同変異が認められた。これらはすべてM株と同じくストレプトマイシン耐性であったが，VNTR24領域が完全一致した株は35株（67.3%）にとどまった。これらの菌株の系統関係を確かめるため，比較ゲノムによって見いだされたM株内部変異（58か所）の有無を全菌株で確かめたところ，関西圏でのみ見出される1系統と，地域に関わらず分離される2系統に分類され，それぞれの拡散経緯が異なることが示唆された。

低罹患率地域における結核菌サーベイランスにおけるゲノム比較．VNTR型別一致による17クラスターのうち，ゲノム一致度が高く，共通感染源による事例と考えられたのは7クラスターであった。一方，それ以外の10クラスターでは菌株間の変異数が多く，直接的な関係は薄いことが示された。高い一致性を示した7クラスターのうち6クラスターは，保健師らによる患者情報の集積によって集団事例の可能性が把握されており，低罹患地域における伝播経路調査では，実地疫学解析がなお重要な役割を担い，分子疫学解析による裏付けがそれを補完できると考えられた。

D. 考察

革新的に発展したゲノム解析技術は，研究のみならず医療，産業，農業など，様々な応用領域において幅広い活用が期待され